

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-120273

(43)Date of publication of application : 08.05.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 9/06
C12Q 1/26
//(C12N 15/09
C12R 1:06)

(21)Application number : 11-301386

(71)Applicant : TOYOB0 CO LTD

(22)Date of filing : 22.10.1999

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIAKI
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) METHOD FOR MODIFYING PROTEIN AND MODIFIED PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a modified protein (e.g. modified sarcosine oxidase) which allows simply assaying flavinadeninedinucleotide.

SOLUTION: This is a method for modifying a protein (e.g. sarcosine oxidase) by deleting, substituting, or adding one amino acid or more from, in, or to an amino acid sequence constituting a protein, particularly modifying an amino acid residue covalently binding to flavin in the amino acid sequence of the protein so that the activity expression can depend on the concentration of flavinadeninedinucleotide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-120273

(P2001-120273A)

(43)公開日 平成13年5月8日(2001.5.8)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ヨーロト ⁸ (参考)
C 12 N 15/09 9/06	ZNA	C 12 N 9/06 C 12 Q 1/26 C 12 R 1:06)	B 4 B 0 2 4 4 B 0 5 0 4 B 0 6 3
C 12 Q 1/26		C 12 N 15/00	ZNA A
# (C 12 N 15/09 C 12 R 1:06)	ZNA	C 12 R 1:06)	

審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平11-301386	(71)出願人	000003160 東洋紡織株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成11年10月22日(1999.10.22)	(72)発明者	西矢 労昭 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡織株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72)発明者	川村 勉久 福井県敦賀市東岸町10番24号 東洋紡織株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名稱】 タンパク質の改変方法および改変タンパク質

(57)【要約】

【課題】 フラビンアデニンジヌクレオチドの簡便な測定を実現できるような改変タンパク質、例えば改変サルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

【解決手段】 タンパク質を構成するアミノ酸配列において若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするタンパク質、例えばサルコシンオキシダーゼの改変方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質を構成するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするタンパク質の改変方法。

【請求項2】 タンパク質がサルコシンオキシダーゼである請求項1記載のタンパク質の改変方法。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質。

【請求項4】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する請求項3記載の改変タンパク質。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する請求項3記載の改変タンパク質。

【請求項6】 請求項3～5のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物から改変タンパク質を採取することを特徴とする改変タンパク質の製造方法。

【請求項7】 請求項3～6のいずれかに記載の改変タンパク質を基質に作用せしめることにより生じる物質を直接あるいは間接的に測定することを特徴とするフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)濃度に依存的である改変タンパク質、すなわちフラビンタンパク質のフラビンと共有結合するアミノ酸残基をタンパク質工学的手法により改変した、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定に用いることのできる活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質、該改変タンパク質の製造方法、および該改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 フラビンアデニンジヌクレオチドは、フラビン結合蛋白の一環であり、リボフラビン(ビタミンB2)の結合蛋白型の一つである。フラビン結合蛋白の多くはフラビンアデニンジヌクレオチドを結合蛋白としており、糖、アミノ酸、脂肪酸の中間代謝、酸化的リン酸化などの生体内の酸化還元反応において広範囲にわたって重要な

働きをしている。通常は、フラビン結合蛋白とは高い親和性で非共有結合しているが、一部の結合蛋白はヒスチジン残基またはシステイン残基で共有結合している。この様に、生体内で重要な働きをするフラビンアデニンジヌクレオチドであるが、簡単な測定法は無く、リボフラビンとして比色法、蛍光法、ルミフラビン蛍光法により測ることしかできなかった。従って、フラビンアデニンジヌクレオチドの簡便な測定系が望まれている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、主として、フラビンアデニンジヌクレオチドの簡便な測定を実現できるような改変タンパク質、例えば、改変サルコシンオキシダーゼを提供することを目的とするものである。

【0004】 上記課題を解決するための最も適切な方法は、フラビンアデニンジヌクレオチドを結合蛋白とする結合蛋白タンパク質がアボ化されたもの、すなわちフラビンアデニンジヌクレオチドが結合していないものを得て、フラビンアデニンジヌクレオチドに対する依存性を利用して測定する方法である。しかしながら、フラビン結合蛋白の結合蛋白との親和性は、解離定数が1～10nMと非常に高く、アボ化タンパク質を調製することは困難である。また、無理にフラビンアデニンジヌクレオチドを解離させようすると、機能の損失につながる恐れが大きい。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成するために、種々検討した結果、フラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的であることを特徴とする改変タンパク質を造成することが可能であることを見出した。さらに、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である該改変タンパク質を利用して、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定を簡便に行なうことが可能なことを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0006】 すなわち、本発明は以下のよう構成からなる。

(1) タンパク質を構成するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするタンパク質の改変方法。

(2) タンパク質がサルコシンオキシダーゼである

(1) のタンパク質の改変方法。

(3) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質。

50 (4) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の

第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する(3)の改変タンパク質。

(5) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する(3)の改変タンパク質。

(6) (3)～(5)のいずれかのアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物から改変タンパク質を採取することを特徴とする改変タンパク質の製造方法。

(7) (3)～(5)のいずれかの改変タンパク質を基質に作用せしめることにより生じる物質を直接あるいは間接的に測定することを特徴とするフラビニアデニンジヌクレオチドの測定方法。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明のタンパク質の改変方法は、該タンパク質を構成するアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を、タンパク質工学的手法を用いることにより改変することにより、該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめ、それによって、該タンパク質の活性発現をフラビニアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするものである。ここで、フラビニアデニンジヌクレオチド濃度に依存的であるということは、タンパク質の触媒活性が系に存在するフラビニアデニンジヌクレオチドの濃度が高いほど高まるることをいうものである。

【0008】本発明により改変されうるタンパク質としては、フラビンタンパク質のフラビンと共有結合するものであれば対象となりうるものであり、特に限定されるものではない。具体的には例えば、サルコシンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、メチルアミノ酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。

【0009】本発明の一実施態様として、フラビニアデニンジヌクレオチドを糖酵素とする酸化酵素であるサルコシンオキシダーゼの改変を一例として説明する。なお、本発明は、サルコシンオキシダーゼの改変に特に限定されるものではない。

【0010】従来から、サルコシンオキシダーゼ(EC 1.5.3.1)は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチニン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチニナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。サルコシンオキシダーゼは基質であるサルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルdehyドおよび過酸化水素を生成する。

【0011】このようなサルコシンオキシダーゼは、バチルス(*Bacillus*)属(特開昭54-52789号公報)、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属(*Journal of Biochemistry* 89, 599 (1981))、シリンドロ

カルボン(*Oxydrocyan*)属(特開昭56-92790号公報)、シェードモナス(*Pseudomonas*)属(特開昭60-43379号公報)等の細菌が生産することが知られている。とりわけ、アースロバクター・エスピーエ(*Arthrobacter sp.*)TE1826(微小研菌寄第10637号)の生産するサルコシンオキシダーゼは、従来のサルコシンオキシダーゼよりも熱安定性に優れ、かつKM値の小さい実用的な酵素であることが既に知られている(特開平2-265478号公報)。これらのサルコシンオキシダーゼは、システイン残基でフラビニアデニンジヌクレオチドと共有結合していることが既に解明されている(*Structure* 7, 331 (1999))。

【0012】本発明者らは、既にアースロバクター・エスピーテE1826より抽出した染色体DNAよりサルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し(*Journal of Fermentation and Bioengineering* 75, 239 (1993))。本サルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度なサルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている(特開平6-113840号公報)。

【0013】本発明において、改変される前のサルコシンオキシダーゼとしては、特に限定されないが、例えば、バチルス属由来のサルコシンオキシダーゼ、シェードモナス属由来のサルコシンオキシダーゼなどが挙げられる。なかでも、アースロバクター・エスピーテE1826(微小研菌寄第10637号)のサルコシンオキシダーゼ(特開平2-265478号公報、特開平6-113840号公報、*Journal of Fermentation and Bioengineering* 75, 239 (1993))を用いるのが好ましい。アースロバクター・エスピーテE1826由来のサルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列は配列表の配列番号1に示す通りである。該サルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列中、第318番目のシステイン残基がフラビニアデニンジヌクレオチドとの共有結合に与する部位として同定されている。

【0014】本発明における、改変されたサルコシンオキシダーゼとしては、例えば、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質が挙げられる。特に、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有することが好ましく、該第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有することが、さらに好ましい。

【0015】本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変す

る手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または消失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit; Clonetech 製、EXO III/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene 製、QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene 製など)の使用、或いはポリメラーゼチャーンリアクション法(PCR)の利用が挙げられる。

【0016】作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと組換された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシエリヒア・コリー(Escherichia coli)を宿主微生物とする場合にはpBluescript、pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシエリヒア・コリーW3110、エシエリヒア・コリーC600、エシエリヒア・コリーJM109、エシエリヒア・コリーDH5αなどが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシエリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテンテントセル(例えば、コンペティントハイ JM109; 東洋紡織製)を用いても良い。

【0017】こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養を行うが、工業的には通気搅拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に適応用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては質化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、ショウガース、ラクトース、マルトース、フラクトース、醸造、ビルピン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシエリヒア・コリーの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0018】培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には前述に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、遠過、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養液から遠過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾソームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0019】この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加热処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル遠過剤などによるゲル遠過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【0020】上記改変タンパク質を用いたフラビンアデニジヌクレオチドの測定方法としては、該改変タンパク質の反応により生じる物質を直接或いは間接的に測定する方法であれば、如何なる方法も利用することができる。例えば、改変タンパク質が改変サルコシンオキシダーゼである場合、サルコシンオキシダーゼの酵素反応により生じる過酸化水素に対し、ペルオキシダーゼの作用によりキノン色素を生成させ、その発色度より定量する方法、酵素反応により生じるホルムアルデヒドにホルムアルデヒド脱水素酵素を使用させ、生成するNADHを紫外部の吸光度により測定する方法などが挙げられる。

【0021】
【実施例】以下、本発明を実施例により、具体的に説明する。なお、実施例中、オキシダーゼ活性の測定は以下のようにして行なった。すなわち、5.0 mMトリス-HCl緩衝液(pH 8.0)、9.5 mMの基質(サルコシン)、0.47 mM 4-アミノアンチビリン、2.0 mMフェノール、4.5 U/mLペルオキシダーゼ中で酵素を37℃、10分反応させ、500 nmにおける吸光度を測定した。

【0022】実施例1 サルコシンオキシダーゼの改変サルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミドpSAE-P3をJournal of Fermentation and Bioengineering 75, 239 (1993)に記載の方法に従い、以下に示す様に調製した。アースロバクター・エスピーティー1826の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を1.00 mLの2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH 7.

2)) で 37°C で一晩振盪培養後、遠心 (8000 rpm, 10 分) により集菌した。15 mM クエン酸ナトリウム、0.15 M 塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20% シューカロース、1 mM EDTA、50 mM トリス-塩酸 (pH 7.6) を含んだ溶液 5 ml に懸濁させ、0.5 ml のリゾチーム溶液 (1.00 mg/ml) を加えて 37°C、30 分間保温した。次いで、1 ml の 1% ラウロイルサルコシン酸、0.1 M EDTA (pH 9.6) を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチジウム溶液を 0.5%、塩化セシウムを約 100% 加えて複合混じ、55000 rpm, 20 時間の超遠心で DNA を分取した。分取した DNA は、1.0 mM トリス-塩酸 (pH 8.0)、1 mM EDTA を含んだ溶液 (TE) で透析し、精製 DNA 標品とした。

【0023】上記精製 DNA 標品 1 μg を制限酵素 SmaI (東洋紡績製) で部分分解反応させ、2 kbp 以上の断片に分解した後、SalI (東洋紡績製) で切断した pUC18 0.5 μg と、M.G.Loftus らの BACKFILLING 法 (Biotechniques Vol12, No.2(1992)) に従い、T4 DNA リガーゼ (東洋紡績製) 1 ユニットで 16°C、12 時間反応させ DNA を連結した。連結された DNA は Hanahan の方法により作成したエシェリヒア コリー JM109 のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用した DNA 1 μg 当たり約 1 × 10⁶ 個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは 50 μg/ml アンビシリソ、0.5% ザルコシン、0.005% バラロースアミニン、及び 0.025% ソディウムハイドロキシカルボネート入りし培地 (1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム) で 37°C、18 時間培養し、赤色コロニーを指標にサルコシンオキシダーゼ遺伝子の導入された組換え DNA をスクリーニングした。

【0024】その結果、約 1000 個のコロニーのうち 1 株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の 1 株が保有するプラスミドには約 8.7 kbp の挿入 DNA 断片が存在しており、このプラスミドを pSAC1 とした。次いで pSAC1 より挿入 DNA 断片を種々の制限酵素により切断して pUC18 にサブクローニングし、約 1.7 kbp の挿入 DNA 断片を有する pSACEP3 を得た。配列表の配列番号 1 に pSACEP3 の挿入 DNA 断片中にコードされているサルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列を記載している。

【0025】本組換えプラスミド pSACEP3 を基に、配列表の配列番号 3 のオリゴヌクレオチドと DNA 中の塩基を変換するキットである Transformer Mutagenesis Kit (Clontech 製) を用い、メーカーのプロトコールに従い変異処理操作を行った。その結果、配列表の配列番号 1 記載の第 318 番目のシスティンがセリンに置換された改変タンパク質 C318S の遺伝情報を有する DNA

を保持するプラスミドを作製することができた。C318S の遺伝情報を有する DNA を種々の制限酵素で切断してサブクローニングを調製し、寡核苷酸配列を決定して SEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit (東洋紡績製) を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。

【0026】C318S は フラビンアデニンヌクレオチドと共有結合できないため、サルコシンオキシダーゼ活性は検出限界以下であった。そこで、精製を容易にするため、C318S のカルボキシ末端にヒスチジン残基が 6 個付加されるように遺伝子を改変した。具体的には、配列表の配列番号 4 および配列番号 5 のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、pSACEP3 を template として、KOD DNA polymerase (東洋紡績製) を用いて PCR を実施した。得られたサルコシンオキシダーゼ遺伝子を PstI と EcoRI で処理し、pUC18 の PstI, EcoRI 消化物とライゲーションした。この操作で作成されたプラスミド pC318S-HT は、C318S のカルボキシ末端にヒスチジン残基が 6 個付加された変異サルコシンオキシダーゼ C318S-HT をコードしている。図 1 にその概略を示す。

【0027】C318S-HT の遺伝情報を有する DNA を種々の制限酵素で切断してサブクローニングを調製し、寡核苷酸配列を決定して SEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit (東洋紡績製) を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。組換え体プラスミド pC318S-HT でエシェリヒア コリー JM109 のコンピテントセルを形質転換し、形質転換体を得た。

【0028】実施例 2 形質転換体の培養と改変タンパク質の精製
30 2 × YT 培地 (1.6% ポリペプトン、1% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム (pH 7.2)) 50 ml を 500 ml フラスコに分注し、121°C、15 分間オートクレーブを行い放冷後、別途無菌通過した 50 ml / ml アンビシリソ (ナカライトスク製) を 0.1% 添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め 37°C で 18 時間振盪培養した形質転換体の培養液 1 ml を接種し、37°C で通気搅拌培養した。培養液より改変タンパク質を、ヒスチジン残基が末端に 6 個付加されたタンパク質を特異的に精製できる NdeExtractor-His-taq-T4 40 ナンバク質精製キット (東洋紡績製) を用いて、SDS-PAGE にて単一のバンドを形成するまで精製した。

【0029】実施例 3 改変タンパク質の評価

精製された改変タンパク質 C318S-HT を用いた、フラビンアデニンヌクレオチド測定結果を図 2 に示す。測定は、サンプル (フラビンアデニンヌクレオチド水溶液) 10 μl と試薬 (50 mM トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0)、95 mM サルコシン、0.47 mM 4-アミノアンチビリン、2.0 mM フェノール、4.5 U/ml ベルオキシダーゼ) 290 μl を混合し、37°C で 2 分間インキュベーション後、酵素溶

9

液(C318S-HT; 約0.4mg(E280)/ml)15μlと神水20μlを加えて混合し、500nmにおける吸光度の増加をみるとことにより行った。図2から明らかのように、測定値はフラビンアデニンジヌクレオチドに対し濃度依存的であった。すなわち、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度依存的である改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定法を確立することができた。

【0030】

【発明の効果】上述したように、本発明によりタンパク質をタンパク質工学的手法を用いて改変し、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定法を確立することができた。

10

*改変タンパク質を供給することが可能となった。すなわち、フラビンタンパク質のフラビンと共有結合するアミノ酸残基をタンパク質工学的手法により改変し、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定に用いることのできる、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質、該改変タンパク質の製造方法、および該改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法が確立された。本発明の改変タンパク質は、細菌の系での遺伝子操作技術による大量生産を実施することができる。

【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：389

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

起源

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.)

株名：TE1826

配列

Met	Ser	Ile	Lys	Lys	Asp	Tyr	Asp	Val	Ile	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Ser			
1									5						10		15	
Met	Gly	Met	Ala	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Gly	Val	Lys	Thr			
															20	25	30	
Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Phe	His	Pro	Pro	His	Thr	Asn	Gly	Ser	His	His			
															35	40	45	
Gly	Asp	Thr	Arg	Ile	Ile	Arg	His	Ala	Tyr	Gly	Glu	Gly	Arg	Glu	Tyr			
															50	55	60	
Val	Pro	Phe	Ala	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Leu	Trp	Tyr	Glu	Leu	Glu	Lys			
															65	70	75	80
Glu	Thr	His	His	Lys	Ile	Phe	Thr	Lys	Thr	Gly	Val	Leu	Val	Phe	Gly			
															85	90	95	
Pro	Lys	Gly	Glu	Ala	Pro	Phe	Val	Ala	Glu	Thr	Met	Glu	Ala	Ala	Lys			
															100	105	110	
Glu	His	Ser	Leu	Asp	Val	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Ser	Glu	Ile	Asn	Lys			
															115	120	125	
Arg	Trp	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Pro	Glu	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ile	Phe	Glu			
															130	135	140	
Lys	Asn	Ser	Gly	Val	Leu	Phe	Ser	Glu	Asn	Cys	Ile	Arg	Ala	Tyr	Arg			
															145	150	155	160
Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Asn	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Thr	Tyr	Thr	Pro	Val			
															165	170	175	
Glu	Asp	Phe	Glu	Ile	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Thr	Ala	Tyr			
															180	185	190	
Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Lys	Leu	Ile	Val	Ser	Met	Gly	Ala	Trp	Asn			
															195	200	205	
Ser	Lys	Leu	Leu	Ser	Lys	Leu	Asn	Ile	Glu	Ile	Pro	Leu	Gln	Pro	Tyr			
															210	215	220	
Arg	Gln	Val	Val	Gly	Phe	Glu	Cys	Asp	Glu	Lys	Lys	Tyr	Ser	Asn				

(7)

特開2001-120273

11

12

225	230	235	240
Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr			
245	250	255	
Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His			
260	265	270	
Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly			
275	280	285	
Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr			
290	295	300	
Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr			
305	310	315	320
Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe			
325	330	335	
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe			
340	345	350	
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys			
355	360	365	
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys			
370	375	380	
Gln Lys Glu Thr Ile			
385			

[0032]

配列番号：2

配列の長さ：1670

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.)

株名：TE1826

配列

CTGGAGTTCT	TCTCCAGCT	TTTGAATCCT	CACCGTAACA	TAACATTCAA	CATAATTAA	6
0						
ACTTTGGCC	CCCTTTGAAA	CCCTCCATA	TTCACCTACC	TTTTGAAAAA	TCTCCAATC	120
TTTAATTTCC	AACTATAATC	ACTCCCAAAA	CGTTCTTTTA	CTACTAGCAC	TAGAATATTT	180
CTAAAGCTA	TACCTGCTAT	CACTTTAACG	CATTTTACAT	GATGCCAAT	AGGGGTATG	240
ATGAAATAG	ATAATTAAGA	AAATTCAAT	TACCTGTTG	AAAAGGAGA	GGAAACA	297
ATG AGT ATT AAA AAA GAT TAT GAT GTC ATT GTG GTC GGC GCT GGT TCC	345					
Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser						
1	5	10	15			
ATG GCA ATG GCA GCT GGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA CGT GTT AAA ACA	393					
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr						
20	25	30				
CTA TTG GTA GAT TCA TTT CAT CCT CCC CAT ACA AAT GGC AGC CAT CAT	441					
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His						
35	40	45				
GCC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GGC GAA CGA AGA GAG TAT	489					
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr						
50	55	60				

(8)

特開2001-120273

13

14

GTC CCG TTT GGC TTG AGA GCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG 537
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
 65 70 75 80
 GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA CGT GTC CTC GTT TTT GGT 585
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 CCT AAA GCA GAA GCT CCT TTC GTC GTC GGC GAA ACA ATG GAA GAA GCA AAG 633
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
 100 105 110
 GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GGA AGT GAA ATA AAT AAG 681
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
 115 120 125
 CGT TCG GCA CGT GTC ACC GTT CCT GAG AAT TAT AAT AAT GCT ATT TTT GAA 729
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
 130 135 140
 AAA AAT TCT CGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT CCC CCT TAC CGT 777
 Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
 145 150 155 160
 GAA TTG CGG GAA GCA AAT CGT CGG AAA GTT CTA ACC TAC ACA CCC GTT 825
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
 165 170 175
 GAA GAT TTC GAG ATT GCC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GCC TAT 873
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
 180 185 190
 GGC TCC TTT ACA CCC ACT AAA TTA ATT GTT ACC ATG GGC CCT TCG AAT 921
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
 195 200 205
 AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC 969
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
 210 215 220
 CGT CAA GTT GTC GCA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT 1017
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn
 225 230 235 240
 ACA CAT CGT TAT CGG CGG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GGC ATC TAT 1065
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr
 245 250 255
 TAC CGA TTT CCA AGC TTC GGC CGC TAC GGC TTG AAA ATA GGC TAT CAT 1113
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His
 260 265 270
 ACG TAT CGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT AGC ATT AAT CGT GAA TTT CGT 1161
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly
 275 280 285
 ATT TAC CGG GAG GAT GAA CGG AAT ATT CGC AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr
 290 295 300
 ATG CGG CGA GCA ACC GGC GAA TTA AAA AGT CGG GCA GTT NNN ATG TAC 1257
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Xaa Met Tyr
 305 310 315 320
 ACA AAA ACA CCT CAT GAG CAT TTC GTG ATT CAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

(9)

特開2001-120273

15

16

325 330 335
TCG AAT GTC CGC ATT GCA GCC CGA TTC TCC CGA CAT CGG TTT AAA TTC 1353
Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe
340 345 350
TCA AGC GTA GTT CCT GAA ACA TTA AGT CAA TTA CCT GTA ACC CGT AAA 1401
Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys
355 360 365
ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT CGC CCT CCT TTA AAA 1449
Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys
370 375 380
CAA AAA CAA AGG ATT TAAAAACCCA ACCAACCGCT ACATAAAATTG CGATAGATAT 1504
Gln Lys Glu Thr Ile
385
TATGTACGCC TTACTTATTAA TACAACCTAA AAATCTGGAT ATCAATCCCTG TCCCCTCTACT 1564
GATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAACCGCT TTTTTATTAA CTTGTAACGA TAACAGGAAC 1570
CTTAAATAAA GAAGACCGCT GCATAACAAT AGTACGGAG GAATTG

[0033]

配列番号：3

配列の長さ：30

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

AAAAGTCCCG CAGTTAGCAT GTACACAAAAA

30

[0034]

配列番号：4

配列の長さ：67

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTCTCTTAA AACAAAAAGA AACGATTAGA TCTACGGAT CCACATACCA TCACCATCAC 60
TGAATTG

67

[0035]

配列番号：5

配列の長さ：49

配列の型：核酸（DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CCCCAGGGTT TTCCCACTCA CCAC

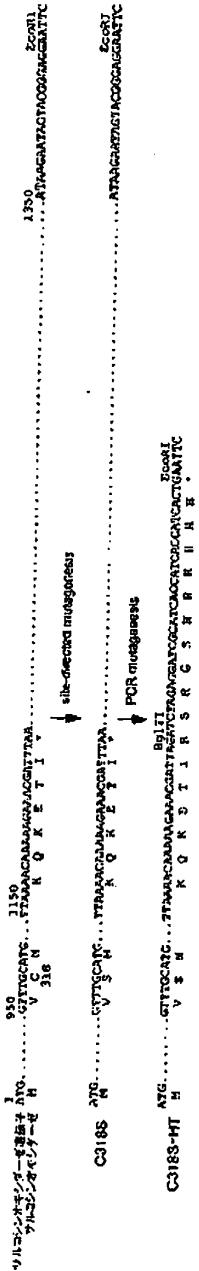
24

【図面の簡単な説明】

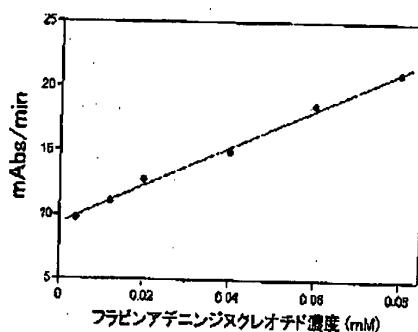
【図1】C318S及びC318S-HTの一次構造の概略を示す図である。

【図2】改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定結果を示す図である。

【図1】



[図2]



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA08 CA03 CA07
CA20 DA06 EA04 GA11 GA19
GA25 GA27 GA30 HA01 HA03
HA11
4B050 CG01 CC04 CC05 DD02 EE01
FF03E FF13E FF14E LL03
LL05
4B063 QA01 Q052 QR03 QR49 QS38
QX01